

**SIMULTANE BESTIMMUNG VON KALLIKREIN,
LYSOZYM UND PEROXYDASE
IM MENSCHLICHEN NASENSEKRET**

Marita Eisenmann

1974
-

Aus dem Biochemischen Laboratorium
der HNO - Universitätsklinik München
Direktor: Professor Dr. med. H. H. Naumann

SIMULTANE BESTIMMUNG VON KALLIKREIN, LYSOZYM UND PEROXYDASE
IM MENSCHLICHEN NASENSEKRET.

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marita Eisenmann
aus
München

München 1973

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. H. Naumann und
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. K. Hochstrasser

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.1974



Herrn Prof. Dr. H. H. Naumann danke ich für
die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr.
K. Hochstrasser für die Überlassung des Themas
und sein Interesse an der Arbeit. Er hat mir,
zusammen mit Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Reichert,
viele wertvolle Hinweise und Ratschläge erteilt.
Einige für die Arbeit notwendigen Geräte wurden
mir freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr.
H. Fritz zur Verfügung gestellt.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

ADH	<u>A</u> lkohol- <u>D</u> eh <u>y</u> drogenase
BAEE	<u>B</u> enzoyl-L- <u>a</u> rgininaethyl- <u>e</u> ster
BAPA	N α - <u>B</u> enzoyl-DL- <u>a</u> rginin-p-nitro <u>a</u> nilid
EmU	<u>E</u> nzym- <u>M</u> illi <u>u</u> nits (=Einheiten)
ImU	<u>I</u> nhibitor- <u>M</u> illi <u>u</u> nits
NAD	<u>N</u> icotinamid- <u>a</u> denin- <u>d</u> inucleotid
POD	<u>P</u> eroxy <u>d</u> ase
TRA	<u>T</u> riäthanol <u>a</u> min

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A) E i n l e i t u n g	1 - 2
B) T h e o r e t i s c h e r T e i l	3 - 9
I) B i o c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n u n d	3 - 4
Wirkungsweise des Inhibitors	
aus Nasensekret	
1) M o l e k u l a r g e w i c h t	3
2) S t a b i l i t ä t	3
3) H e m m v e r h a l t e n	3 - 4
II) B i o c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n u n d	4 - 6
Wirkungsweise von Kallikrein	
1) V o r k o m m e n	4 - 5
2) S t a b i l i t ä t	5
3) W i r k u n g i m O r g a n i s m u s	5 - 6
III) B i o c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n u n d	6 - 7
Wirkungsweise von Lysozym	
1) V o r k o m m e n	6
2) M o l e k u l a r g e w i c h t	6
3) S t a b i l i t ä t	6 - 7
IV) B i o c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n u n d	7 - 8
Wirkungsweise von Peroxydasen	
1) V o r k o m m e n	7
2) M o l e k u l a r g e w i c h t	8

	Seite
3) Stabilität	8
4) Wirkung im Organismus	8
C) Ergebnisse	9 - 32
I) Quantitativer Nachweis von Kallikrein im Nasensekret des Menschen	9 - 17
1) Identifizierung	9 - 12
a) BAEE-Test	9
b) Trasylolemmkurve	10
c) Versuch der Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein durch Leuko- zytenproteasen	10
d) Hundeblutdruckversuch	10 - 12
2) Berechnung	12 - 13
3) physiologische Werte	13
4) pathologische Werte	13 - 17
II) Quantitativer Nachweis von Lysozym im Nasensekret des Menschen	18 - 23
1) Identifizierung	18
2) Berechnung	18
3) physiologische Werte	18
4) pathologische Werte	20 - 23

	Seite
III) Quantitativer Nachweis von Peroxydasen im Nasensekret des Menschen	24 - 26
1) Identifizierung	24
2) Berechnung	24
3) physiologische Werte	24
4) pathologische Werte	24 - 26
IV) Gegenüberstellung der Verlaufs- kontrollwerte mit den Inhibitor- werten einzelner Patienten	27 - 32
D) Diskussion	33 - 35
E) Experimenteller Teil	36 - 45
I) Sekretentnahme	36
II) Proteinbestimmung im Nasensekret	36 - 37
1) Material	36
2) Methode	36 - 37
III) Kallikreinbestimmung im Nasensekret	37 - 42
1) BAEE-Test	37 - 38
a) Material	37
b) Methode	37 - 38
2) BAPA-Test	38 - 39
a) Material	38
b) Methode	38 - 39

	Seite
3) Hemmwertbestimmung	39
4) Trasylolhemmkurve von Nasensekret	40
a) Material	40
b) Methode	40
5) Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein durch Leuko- zytenproteasen	40 - 42
a) Bestimmung der Proteasen- aktivität	40 - 41
α) Material	40 - 41
β) Methode	41
b) Hemmbarkeit der Leuko- zytenproteasen durch den Inhibitor aus Nasensekret	41
c) Aktivierungsversuch	42
6) Hundeblutdruckversuch	42
IV) Lysozymbestimmung im Nasensekret	43 - 44
1) Material	43
2) Methode	43
3) Eichkurve	43 - 44
a) Material	43 - 44
b) Methode	44
V) Peroxydasebestimmung im Nasensekret	44 - 45
1) Material	44
2) Methode	44 - 45
F) Zusammenfassung	46 - 47
G) Literaturverzeichnis	48 - 51

A) EINLEITUNG

HOCHSTRASSER und Mitarb. (1) beschrieben erstmals das Vorkommen eines niedermolekularen Proteasen-inhibitors im menschlichen Nasensekret. Der Inhibitor hemmt die katalytische Wirkung von Trypsin, Chymotrypsin, Pronase und einigen leukozytären Proteasen (2).

REICHERT (3) beobachtete die Veränderung des physiologischen Inhibitorgehalts im menschlichen Nasensekret während des Verlaufs verschiedener Rhinopathien.

Um Einblick in die dabei ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge zu gewinnen, war es nötig, weitere Parameter für die Funktionsfähigkeit der Nasenschleimhaut heranzuziehen.

Das Enzym Kallikrein setzt aus den Kininogenen die stark blutdrucksenkenden Kinine frei. Im entzündeten Gewebe kommt es zur Aktivierung von Gewebsproteasen, die wiederum das entzündungsverstärkende Kallikrein-Kinin-System aktivieren (4).

HOCHSTRASSER und Mitarb. konnten feststellen, daß ein Teil dieser Gewebsproteasen durch den Inhibitor aus Nasensekret gehemmt wird (2). Man vermutet deshalb, daß dem Inhibitor eine Schutzfunktion zukommt.

Um die Grenzen dieses Systems aufzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich das Enzym Lysozym, das ebenso wie der Inhibitor von der Nasenschleimhaut produziert wird, im Sekret nachgewiesen. Sein Gehalt wurde parallel zum Inhibitor im Verlauf der einzelnen Rhinopathien bestimmt und läßt Schlüsse auf den Grad der Schleimhautschädigung zu.

Als Parameter für die beim Leukozytenzerfall freierwerdenden Proteasen, die auch vom Inhibitor gehemmt werden, wurde die ebenfalls in den Leukozytengranula vorkommende Peroxydase in ihrer Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf kontrolliert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Methoden für den Nachweis von Kallikrein, Lysozym und Peroxydase im Nasensekret erstellt werden. Zudem sollten tägliche Verlaufskontrollen der drei Enzyme bei den einzelnen Rhinopathien zur Klärung der pathophysiologischen Abläufe beitragen.

B) THEORETISCHER TEIL

I) Biochemische Eigenschaften und Wirkungsweise des Inhibitors aus Nasensekret

1) Molekulargewicht

Das in Boratpuffer eluierte Nasensekret wurde durch Gelfiltration an Sephadex G-75 fraktioniert. Dabei konnten die hochmolekularen Mucine und Proteine von der inhibitorischen Aktivität abgetrennt werden. Aus dem Puffervolumen, das zur Eluierung des Inhibitors aus dem Molekülsieb notwendig ist, konnte man auf ein Molekulargewicht des Inhibitors von 13 000 schließen (1).

2) Stabilität

Wie HOCHSTRASSER und Mitarb. beweisen konnten, handelt es sich um einen säurestabilen Inhibitor (5).

3) Hemmverhalten

Der Inhibitor hemmt die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Pronase. Plasmin, Kallikrein, Subtilisin und Elastase werden nicht gehemmt.

Man kann den Inhibitor als "double-headed" bezeichnen, da er entweder 2 Moleküle Chymotrypsin oder 1 Molekül Trypsin zu hemmen vermag. Wird der Hemmstoff mit Trypsin abgesättigt oder sein Trypsinhemmzentrum durch Acylierung inaktiviert, so verringert sich seine Hemmkapazität gegen Chymotrypsin um 45 bzw. 30%. Bei Absättigung des Inhibitors mit Chymotrypsin geht seine Hemmwirkung gegen Trypsin vollständig verloren.

II) Biochemische Eigenschaften und Wirkungsweise von Kallikrein

1) Vorkommen

Bei Mensch und Säugetier wurde Kallikrein im Pankreas, im Harn und in den Speicheldrüsen gefunden. FREY und Mitarb. (4) konnten erstmals eine inaktive Vorstufe, das Präkallikrein oder Kallikreinogen im Pankreas und Serum nachweisen.

Obwohl sich die Kallikreine aus Harn und Speicheldrüsen in manchen Eigenschaften unterscheiden, liefern sie ein gemeinsames Spaltprodukt des Kininogens, das Kalli-

kin. Das wenig stabile Kallikrein aus Serum und das Pankreaskallikrein spalten aus Kininogen primär Kallidin ab, das durch ein weiteres Enzymsystem in Bradykinin umgewandelt werden kann (6,7). Weitere Proteasen inaktivieren Bradykinin.

2) Stabilität

Die inaktive Vorstufe des Kallikreins, das Kallikreinogen oder Präkallikrein, verhält sich sehr viel stabiler als das Kallikrein selbst. Die instabilste Form des Kallikreins liefert das Serum (7).

3) Wirkung im Organismus

Kallikreine weisen eine sehr hohe Substratspezifität auf. Sie spalten zwei Peptidbindungen des Glykoproteids Kininogen und setzen dadurch die pharmakologisch wirksamen Kinine frei (9). Beim Kallikrein aus Serum besteht außerdem eine geringe unspezifische proteolytische Aktivität. Die Wirkung der Kinine auf den Organismus umfaßt: Senkung des Blutdrucks (schon in ng-Mengen), Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Erzeugung von Kontraktionen in

glattnuskulären Organen (z.B. Darm, Uterus) und Schmerzerzeugung (10,11).

III) Biochemische Eigenschaften und Wirkungsweise von Lysozym

1) Vorkommen

Lysozym konnte bisher im Blut und in Drüsensekreten (z.B. Tränenflüssigkeit, Sputum, Nasensekret, Fruchtwasser, Milch) und in Eiern nachgewiesen werden (12). Ferner ist es in fast allen Geweben enthalten.

2) Molekulargewicht

Das Lysozym gehört zur Gruppe der heterogenen Enzyme. Die Molekulargewichte der einzelnen Isoenzyme bewegen sich um 15 000 (13).

3) Stabilität

Lysozym ist bei saurem pH-Wert stabil, bei alkalischem instabil. Die biologische Aktivität bleibt sogar dann erhalten, wenn die Enzymlösung bei pH 4,5

3 Minuten lang eine Temperatur von 100°C aufweist (14).

4) Wirkung im Organismus

Der antibakterielle Effekt von Lysozym ist auf seine Fähigkeit zum Abbau von Bakterienzellen zurückzuführen (15). Es wirkt mit Sicherheit auf Gram-positive Keime (16), bei einigen Gram-negativen kommt es unter seiner Einwirkung zu einer unspezifischen Zellwandschädigung (17). Weiterhin wird dem Lysozym ein entzündungshemmender Effekt zugeschrieben (18).

IV) Biochemische Eigenschaften und Wirkungsweise von Peroxydasen

1) Vorkommen

Aus der Gruppe der Peroxydasen soll hier nur die Hämoproteid-Peroxydase besprochen werden. Die Hp-POD wurde bei Säugetieren in Mikrosomen und Mitochondrien gefunden. Einen besonders hohen POD-Gehalt weisen die Leukozyten auf (19). Auch Knochenmark, Milz, Sperma und Lymphknoten enthalten POD.

2) Molekulargewicht

Für die aus Leukozyten stammende Peroxydase wurde ein Molekulargewicht von 150.000 gefunden.

3) Stabilität

Die Stabilität des Enzyms variiert beträchtlich. Sie ist abhängig von der Zusammensetzung der Probe.

4) Wirkung im Organismus

Die Hp-POD überträgt Wasserstoff von einem Donor auf H_2O_2 . Da sie beim Zerfall von Leukozyten frei wird, läßt sie Schlüsse auf den Eitergehalt eines Sekrets zu.

C) ERGEBNISSE

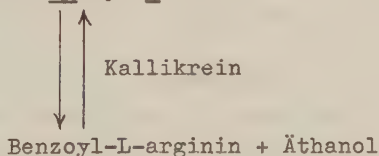
I) Quantitativer Nachweis von Kallikrein im Nasensekret des Menschen

1) Identifizierung

a) Nachweis von Kallikrein durch BAEE-Test (6)

Das im Nasensekret vorhandene Präkallikrein wird mit Hilfe von Trypsin aktiviert. Da Trypsin das Substrat BAEE ebenfalls spaltet, wird es anschließend durch einen spezifischen Trypsininhibitor gehemmt. Die Reaktion mit BAEE verläuft dann nach folgendem Prinzip:

Benzoyl-L-argininaethyl-ester



Sie wird folgendermaßen sichtbar gemacht:



Die Zunahme der NADH-Extinction bei 366 nm gilt als Maß für die pro Zeiteinheit umgesetzte Äthanolmenge und damit als Maß für die Aktivität des Kallikreins.

b) Erstellung einer Trasylolhemmkurve

Da auch noch einige andere Enzyme BAEE spalten können, mußten weitere Kriterien zur Identifizierung herangezogen werden.

Führt man den BAEE-Test mit steigenden Mengen Trasylol durch, so müßte es zu einer Hemmung der Esterase-Aktivität kommen, wenn es sich bei dem gefundenen Enzym um Kallikrein handelt (4).

Die Ergebnisse der Hemmversuche belegen, daß die im Nasensekret durch Trypsin freilegbare esterolytische Aktivität auf Kallikrein zurückzuführen ist. (Abb. 1)

c) Versuch der Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein durch Leukozytenproteasen

Die Vermutung, daß Leukozytenproteasen Präkallikrein zu Kallikrein aktivieren könnten, hat sich in unserem Versuch nicht bestätigt.

d) Test am Hundeblutdruck (4)

Kallikrein bewirkt beim Säugetier eine Blutdrucksenkung. Die Injektion in den Kreislauf des Versuchstieres führte zu einem deutlichen Druckabfall.

Die Umrechnung des BAEE-Kontrolltests auf die applizierte Menge ließ den Schluß zu,

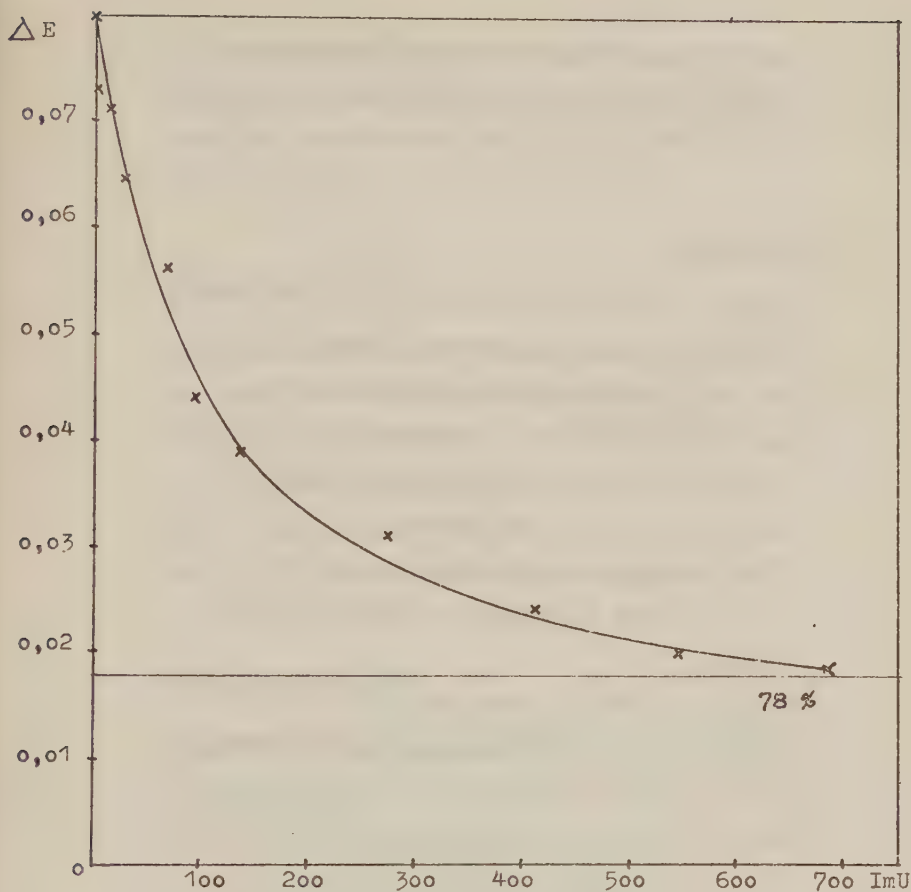


Abb. 1) Hemmung der Esterase-Aktivität von Nasensekret durch Trasylol

Abszisse: Trasylolzugabe in ImU

Ordinate: Extinctionsänderung in ΔE

daß die gesamte BAEE-spaltende Aktivität im Nasensekret auf das Kallikrein zurückzuführen ist.

2) Berechnung

Bisher wurde die Kallikreinaktivität in biologischen Einheiten gemessen. Dabei galt als 1 Kallikreineinheit (1 KE) die Menge, die bei intravenöser Injektion in der Arteria carotis des Hundes den gleichen Druckabfall bewirkt wie 5 ml Menschenharn, die aus 50 l einer Sammelprobe entnommen wurden und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysiert wurden.

Da die BAEE-Testmethode weniger Aufwand erfordert als die Abklärung am Hundeblutdruck, wurde die Kallikreinaktivität neu definiert. Man spricht nunmehr von internationalen Einheiten (= IU) bzw. Milliunits. 1 ImU Kallikreinaktivität bewirkt bei einem Küvettenvolumen von 3,0 ml eine Extinctionsänderung von 0,0011 E/min, was dem Umsatz von 1 nMol Substrat/min entspricht.

Eine internationale Kallikreineinheit ergibt bei der Umrechnung ungefähr 10 biologische Kallikreineinheiten (6).

Als Bezugsgröße für die Aktivität des Kallikreins wurde auch hier, wie schon beim Inhibitor aus Nasensekret, der Proteingehalt des Sekrets gewählt.

3) Physiologische Werte

Als Durchschnittswert gesunder oder vollständig geheilter Patienten ergab sich eine Aktivität von 138 Kallikreinmilliunits/mg Protein. Dieser Wert entspricht dem Gipfel einer Gauß'schen Verteilungskurve, deren Extremwerte bei 156 und 117, also etwa ± 20 mU liegen.

4) Pathologische Werte

<u>Diagnose</u>	<u>Kallikreinmilliunits/mg Protein</u>
-----------------	--

Akute Rhinitis:

Pat.1 (3. Behandlungstag)	33,6
Pat.1 (5. Behandlungstag)	41,5

Chronische Rhinitis:

Pat.1	50,0
Pat.2	54,8
Pat.3	93,5

Rhinitis sicca:

Pat.1	83,2
-------	------

Diagnose Kallikreinmilliunits/mg Protein

Rhinitis allergica:

Pat.1 (hochakutes Stadium) 20,0

Pat.2 (hochakutes Stadium) 16,2

Präocaena:

Pat.1 24,4

Pat.2 51,0

Ocaena:

Pat.1 55,3

Pat.2 19,3

Pat.3 4,9

Pat.4 10,2

Pat.5 10,0

Pat.6 13,6

Pat.7 21,2

Pat.8 11,2

Pat.9 27,3

Pat.10 14,8

Verlaufskontrolle während der Behandlung:

Pat.11 (1. Behandlungstag) 24,4

(13. Behandlungstag) 24,4

(19. Behandlungstag, 51,0

Besserung der sub-

jektiven Beschwerden)

Pharyngitis:

Pat.1 38,7

Diagnose Kallikreinmilliunits/mg Protein

Tubenkatarrh:

Pat.1 42,5

Akute Sinusitis:

Pat.1 (1. Behandlungstag, beide

Seiten betroffen)

links 32,0

rechts 38,5

Pat.2 (1. Behandlungstag,

einseitig)

gesunde Seite 109,0

krankte Seite 22,9

(4. Behandlungstag)

gesunde Seite 137,0

krankte Seite 85,0

Pat.3 (1. Behandlungstag) 15,3

(8. Behandlungstag) 131,5

Pat.4 (1. Tag, einseitig)

gesunde Seite 154,0

krankte Seite 28,0

Pat.5 (4. Behandlungstag, 85,0

bereits Besserung)

Pat.6 (10. Behandlungstag, 128,5

fast geheilt)

Pat.7 (14. Behandlungstag, 146,0

fast geheilt)

Pat.8 (7. Behandlungstag, 90,5

bereits gebessert)

<u>Diagnose</u>	<u>Kallikreinmilliunits/mg Protein</u>
-----------------	--

Pat.9 (5. Behandlungstag)	68,9
Pat.10 (3. Behandlungstag)	42,0
Pat.11 (12. Behandlungstag,	137,0
gute Heilungstendenz)	

Subakute Sinusitis:

Pat.1 (1. Behandlungstag)	72,0
Pat.2 (1. Behandlungstag)	55,0
Pat.3 (1. Behandlungstag)	93,0

Zustand nach Radikaloperation:

Pat.1	52,2
Pat.2	75,0
Pat.3	70,3

Pansinusitis:

Pat.1	41,0
-------	------

Sinusitis frontalis:

Pat.1	70,0
-------	------

Mastoiditis:

Pat.1	68,0
-------	------

Klippel-Trenaunay-Syndrom:

Pat.1 rechte Seite	46,4
linke Seite	125,0

Lupus vulgaris:

Pat.1	50,0
-------	------

II) Quantitativer Nachweis von Lysozym im Nasensekret des Menschen

1) Identifizierung

Nach der Methode von Pierre Jollès (13) verwendet man als Substrat eine Bakterien-suspension von *Micrococcus lysodeicticus* (20-22). Die Aufschwemmung ist milchig-trüb. Durch Zugabe einer lysozymhaltigen Lösung wird die Suspension klar.

2) Berechnung

Mit Hilfe eines Lysozymstandardpräparates wird eine Eichkurve erstellt, aus der die im Sekret enthaltene Lysozymmenge direkt abgelesen werden kann. Wir legten als 1 μ Lysozym aus Nasensekret die Menge fest, die in ihrer Aktivität einem Milligramm des Lysozymstandardpräparates entspricht. Sie wird ebenfalls auf den Proteingehalt des Nasensekrets bezogen. (Abb. 2)

3) Physiologische Werte

Die Kontrollwerte Gesunder betrugen zwischen 40 und 60 μ /mg Protein.

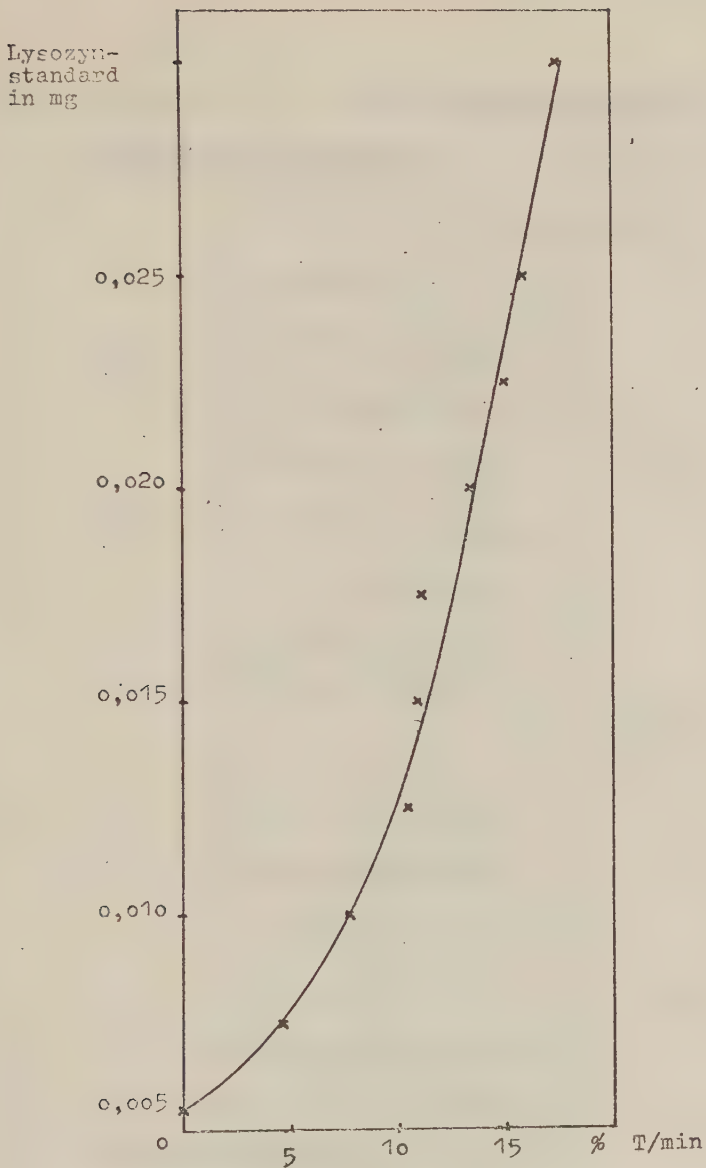


Abb. 2) Eichkurve von Lysozym

Abszisse: Transmissionsänderung in Prozent
pro Minute (T %/min)

Ordinate: Lysozymstandardpräparat in mg

4) Pathologische Werte

Diagnose Lysozym in μ /mg Protein

Akute Rhinitis:

Pat.1	(1. Behandlungstag)	1,7
	(3. Behandlungstag)	42,0
	(4. Behandlungstag)	56,9
	(5. Behandlungstag)	55,0
Pat.2	(1. Behandlungstag)	74,2
	(3. Behandlungstag)	42,5
	(4. Behandlungstag)	157,5
	(7. Behandlungstag)	147,5
	(8. Behandlungstag)	105,0
	(10. Behandlungstag)	125,0

Akute Sinusitis:

Pat.1	(1. Behandlungstag)	68,8
	(2. Behandlungstag)	58,2
	(7. Behandlungstag)	107,5
	(15. Behandlungstag)	62,5
	(16. Behandlungstag)	49,0
Pat.2	(1. Behandlungstag)	38,3
	(6. Behandlungstag)	75,0
	(8. Behandlungstag)	45,0
Pat.3	(1. Behandlungstag)	31,0
	(3. Behandlungstag)	49,0
	(8. Behandlungstag)	62,0

<u>Diagnose</u>	<u>Lysozym in μ/mg Protein</u>	
Pat.4	(1. Behandlungstag)	7,4
	(2. Behandlungstag)	5,1
	(5. Behandlungstag)	22,7
	(7. Behandlungstag)	34,0
	(9. Behandlungstag)	50,0
Pat.5	(1. Behandlungstag)	3,4
	(3. Behandlungstag)	18,0
	(7. Behandlungstag)	15,8
Pat.6	(1. Behandlungstag)	11,2
	(3. Behandlungstag)	19,0
Pat.7	(1. Behandlungstag)	55,8
	(4. Behandlungstag)	40,5
	(5. Behandlungstag)	63,2
	(7. Behandlungstag)	57,1
	(8. Behandlungstag)	250,0
	(11. Behandlungstag)	106,0
Pat.8	(1. Behandlungstag)	18,6
	(4. Behandlungstag)	47,6
	(5. Behandlungstag)	57,1
	(6. Behandlungstag)	41,4
	(7. Behandlungstag)	44,0
	(8. Behandlungstag)	95,6

Chronische Rhinitis:

Pat.1	(1. Behandlungstag)	45,0
	(3. Behandlungstag)	38,0
	(4. Behandlungstag)	40,0
	(5. Behandlungstag)	55,0
	(12. Behandlungstag)	81,0

Zu Beginn einer Infektionserkrankung erfolgte jeweils ein Abfall der Lysozymkonzentration. Im Laufe der Ausheilung kam es zu erhöhten Gewebsreaktionen und damit zu überschüssigen Lysozymkonzentrationen, die sich dann schließlich wieder auf den physiologischen Wert einpendelten. (Abb. 3, 4, 5)

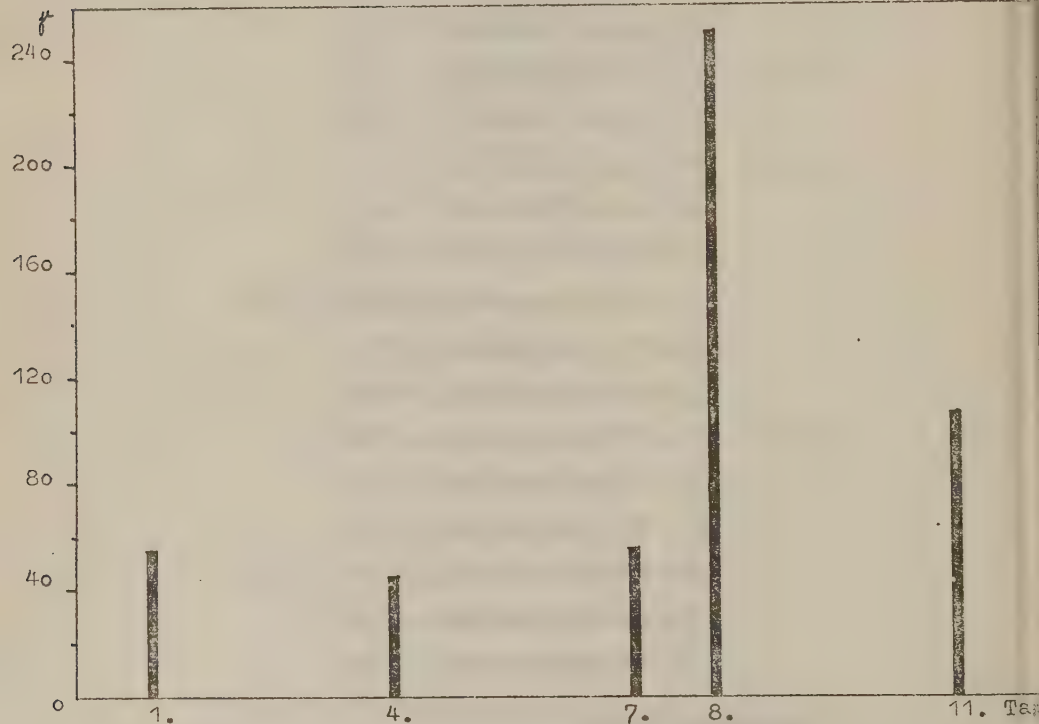


Abb. 3) Änderung der Lysozymkonzentrationen in Nasensekret im Verlauf einer akuten Sinusitis (Pat.7)
Abszisse: Behandlungstage
Ordinate: Lysozymaktivität in %/mg Protein

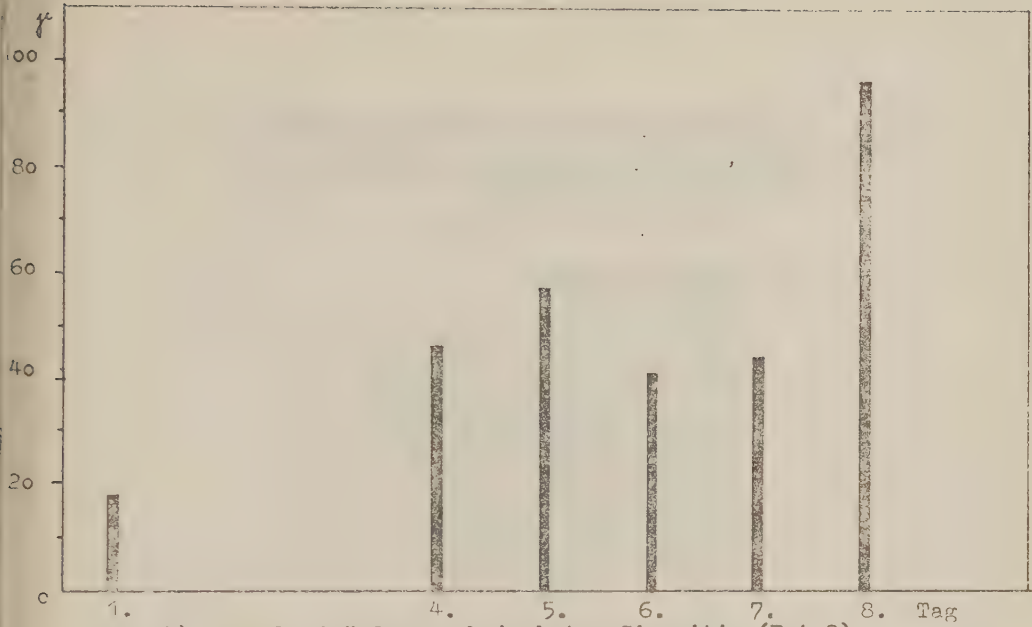


Abb. 4) Verlaufsänderung bei akuter Sinusitis (Pat. 8)

Abszisse: Behandlungstage

Ordinate: Lysozymaktivität in μ /mg Protein

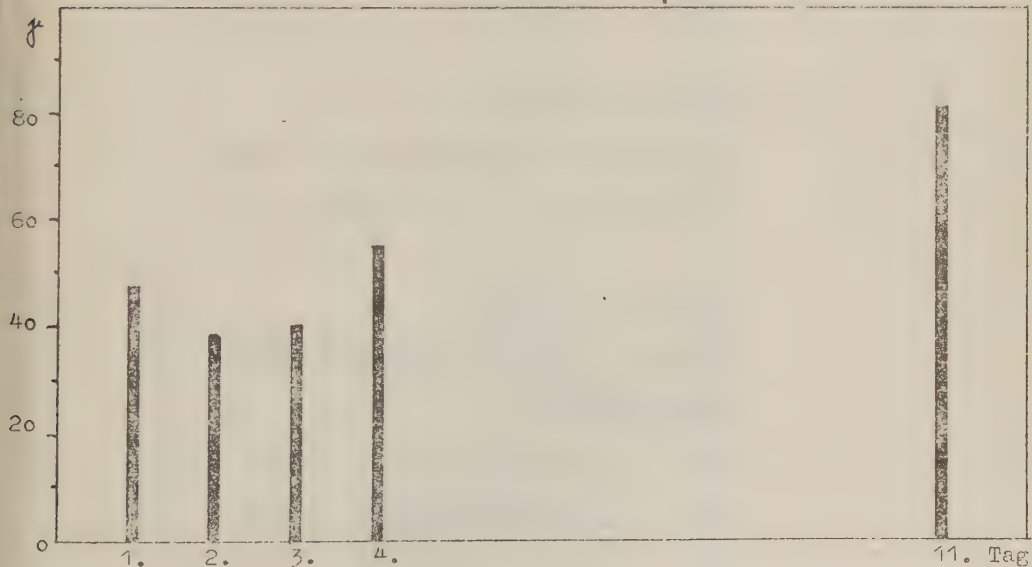


Abb. 5) Verlaufsänderung bei chron. Rhinitis (Pat. 1)

Abszisse: Behandlungstage

Ordinate: Lysozymaktivität in μ /mg Protein

III) Quantitativer Nachweis von Peroxydase im
Nasensekret des Menschen

1) Identifizierung

Die Peroxydasen spalten aus H_2O_2 Sauerstoff ab und übertragen ihn auf ein geeignetes Substrat (23). Wir verwendeten hierzu Benzidin, das durch die Peroxydasen zu einem blauen Farbstoff oxydiert wird (30).

2) Berechnung

Als Einheit wählten wir die Extinctionszunahme pro Zeiteinheit und mg Protein.

3) Physiologische Werte

Im Nasensekret des Gesunden ist keine Peroxydaseaktivität nachweisbar.

4) Pathologische Werte

Diagnose Peroxydase in ΔE /mg Protein

Akute Sinusitis:

Pat.1	(1. Behandlungstag)	0,038
	(3. Behandlungstag)	0,212
	(6. Behandlungstag)	0,037

Diagnose Peroxydase in ΔE /mg Protein

Pat.2	(1. Behandlungstag)	0,009
	(2. Behandlungstag)	0,028
	(5. Behandlungstag)	0,103
	(7. Behandlungstag)	0,220
	(9. Behandlungstag)	0,196
	(14. Behandlungstag)	0,115
	(41. Behandlungstag)	0,004
Pat.3	(1. Behandlungstag)	0,049
	(3. Behandlungstag)	0,081
Pat.4	(1. Behandlungstag)	0,015
	(3. Behandlungstag)	0,050
Pat.5	(1. Behandlungstag)	0,540
	(2. Behandlungstag)	0,655
	(6. Behandlungstag)	0,360
	(7. Behandlungstag)	0,174
	(8. Behandlungstag)	0,345
	(9. Behandlungstag)	0,190
Pat.6	(13. Behandlungstag)	0,138
	(1. Behandlungstag)	0,168
	(4. Behandlungstag)	0,079
	(5. Behandlungstag)	0,094
	(7. Behandlungstag)	0,182
	(8. Behandlungstag)	0,265
Pat.7	(11. Behandlungstag)	0,014
	(1. Behandlungstag)	0,262
	(4. Behandlungstag)	0,143
	(5. Behandlungstag)	0,445
	(6. Behandlungstag)	0,128
	(8. Behandlungstag)	0,150

Das Maximum des POD-Gehalts deckt sich mit dem Höhepunkt der klinischen Manifestation. Bei bluthaltigem Sekret ist kein Peroxydase-nachweis durchführbar, da die in den Erythrozyten vorhandene Peroxydase-aktivität das Ergebnis verfälschen würde.

(Abb. 6)

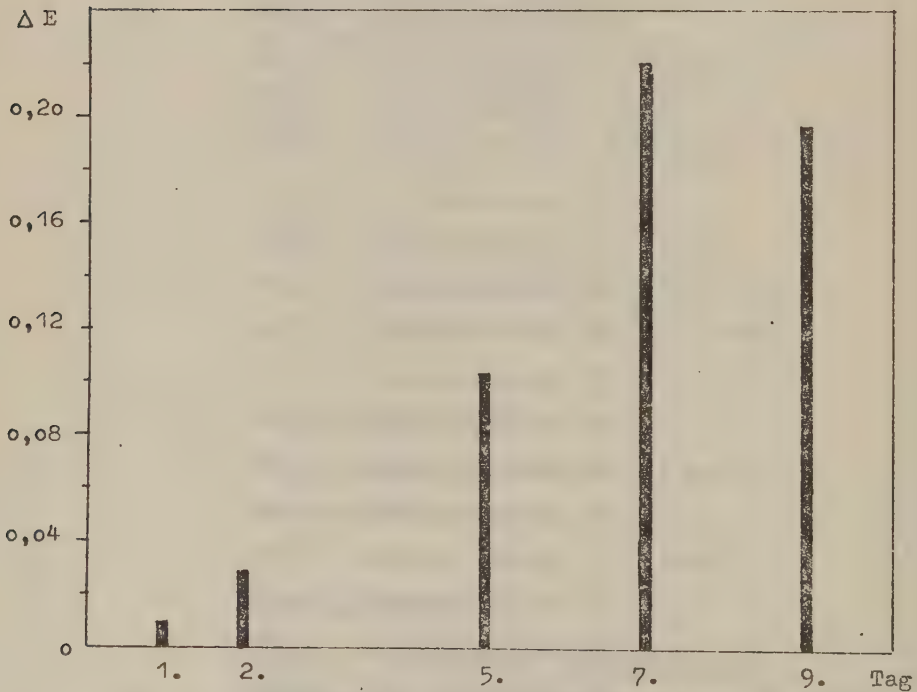


Abb. 6) Änderung der Peroxydasekonzentration in Nasensekret im Verlauf einer akuten Sinusitis (Pat.2)

Abszisse: Behandlungstage

Ordinate: Peroxydaseaktivität in $\Delta E/mg$ Protein

IV) Gegenüberstellung der Verlaufskontrollwerte
mit den Inhibitorwerten einzelner Patienten

Leider war es nicht möglich, einen Vergleich der Kallikreinwerte mit den übrigen Kontrollwerten durchzuführen, da eine weitere Verdünnung des entnommenen Sekrets zu ungenaue Ergebnisse geliefert hätte. (Abb. 7, 8)

Diagnose	Behandlungs- tag	Peroxydase $\Delta E/mg$ Pr.	Lysozym μ/mg Pr.	Inhibitor ImU/mg Pr.
Pat.1	1.	0,010	7,4	4,6
(akute	2.	0,028	5,1	6,1
Sinusitis)	5.	0,103	22,7	7,8
	7.	0,220	34,0	10,8
	9.	0,196	50,0	15,1
	14.	0,115		
	41. (gesund)	0,004		
Pat.2	1.	0,049	3,4	4,0
(akute	3.	0,081	18,0	3,4
Sinusitis)	7.		15,8	4,0
Pat.3	1.	0,015	11,2	3,7
(akute	3.	0,050	19,0	12,8
Sinusitis)				

Diagnose	Behandlungs- tag	Peroxydase $\Delta E/mg$ Pr.	Lysozym μ/mg Pr.	Inhibitor ImU/mg Pr.
Pat.4	1.	0,540		1,8
(akute	2.	0,655		2,9
Sinusitis)	6.	0,360		8,5
	7.	0,174		9,2
	8.	0,345		11,1
	9.	0,190		10,2
	13.	0,138		10,2

Pat.5	1.	0,168	55,8	9,3
(akute	4.	0,079	40,5	13,0
Sinusitis)	5.	0,094	63,2	10,7
	7.	0,182	57,1	11,8
	8.	0,265	250,0	11,2
	11.	0,014	106,0	10,1

Pat.6	1.	0,262	18,6	0,6
(akute	4.	0,143	47,6	10,1
Sinusitis)	5.	0,445	57,1	14,2
	6.	0,128	41,4	10,2
	7.	-	44,0	15,2
	8.	0,150	95,6	11,1

Pat.7	1.		38,3	10,2
(akute	6.		75,0	17,7
Sinusitis)	8.		45,0	20,0

Diagnose	Behandlungs- tag	Peroxydase $\Delta E/mg$ Pr.	Lysozym μ/mg Pr.	Inhibitor ImU/mg Pr.
Pat.8	1.		68,8	8,5
(akute	2.		58,2	9,5
Sinusitis)	7.		107,5	27,0
	15.		62,5	28,7
	16.		49,0	38,0
Pat.9	1.		31,0	8,0
(akute	3.		49,2	16,2
Sinusitis)	8.		62,0	10,7
Pat.10	1.	0,038		1,3
(akute	3.	0,212		4,5
Sinusitis)	6.	0,037		11,4
Pat.11	1.		1,7	1,1
(akute	3.		42,0	6,0
Rhinitis)	4.		56,9	8,8
	5.		55,0	12,6
Pat.12	1.		74,2	19,2
(akute	3.		42,5	6,4
Rhinitis)	4.		157,5	21,5
	7.		147,5	48,5

Diagnose	Behandlungs- tag	Peroxydase $\Delta E/mg$ Pr.	Lysozym μ/mg Pr.	Inhibitor ImU/mg Pr.
	8.		105,0	45,0
	10.		125,0	38,5
	17.(gesund)		25,0	31,0

Pat.13	1.		45,0	6,0
(chron.	3.		38,2	12,0
Rhinitis)	4.		40,1	17,4
	5.		55,0	16,8
	12.		81,0	7,2

Abb. 7) Gegenüberstellung der Konzentrationen von Peroxydase, Lysozym und Inhibitor im Verlauf einer akuten Sinusitis (Pat.1)

Abszisse: Behandlungstage

Ordinate links: oben: Peroxydaseaktivität
in $\Delta E/mg$ Protein
(pro 10 min)

unten: Lysozym in μ/mg Protein

Ordinate rechts: Inhibitor in ImU/mg Protein

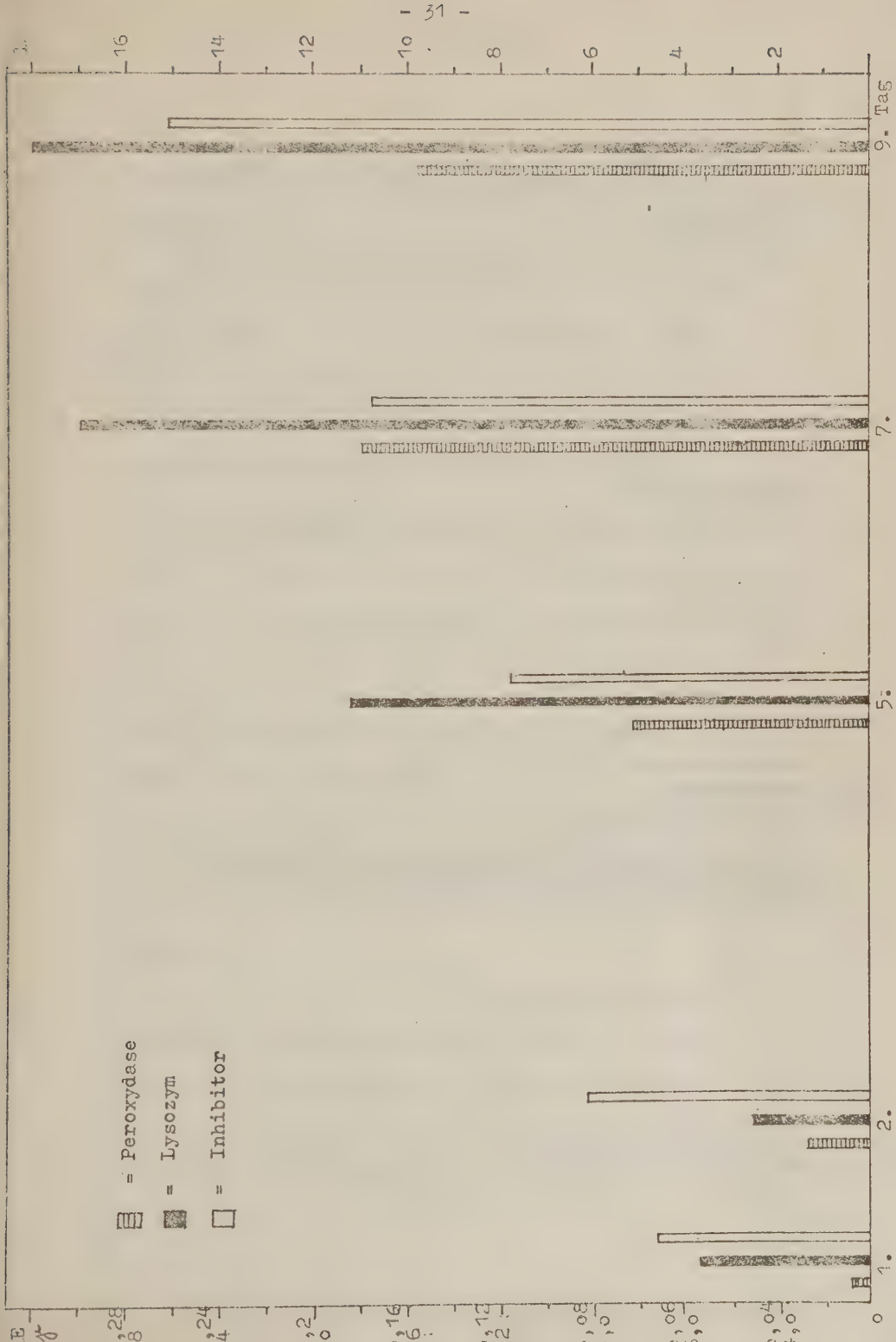
Abb. 8) Gegenüberstellung der Konzentrationen von Peroxydase, Lysozym und Inhibitor im Verlauf einer akuten Sinusitis (Pat.5)

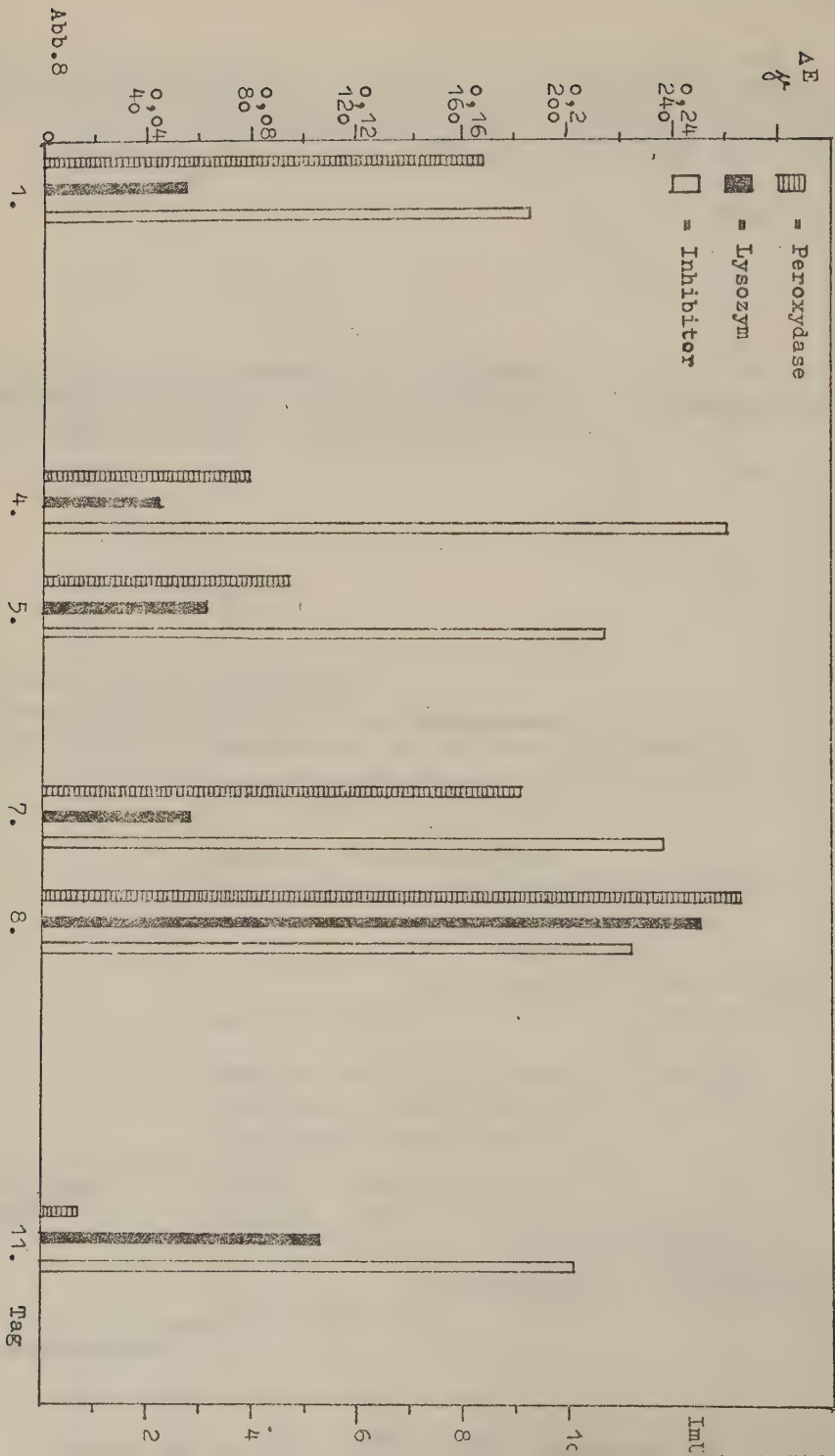
Abszisse: Behandlungstage

Ordinate links: oben: Peroxydaseaktivität
in $\Delta E/mg$ Protein

unten: Lysozym in μ/mg Protein

Ordinate rechts: Inhibitor in ImU/mg Protein





D) DISKUSSION

Die Konzentrationsänderung des Inhibitors aus Nasensekret unter pathologischen Bedingungen wurde bereits von REICHERT und Mitarb. (24) beschrieben. Es mußte nun abgeklärt werden, auf welche Mechanismen dieser Abfall des Inhibitorspiegels zurückzuführen sei.

HOCHSTRASSER und Mitarb. (2) gelang der Nachweis, daß 70% der im pathologischen Nasensekret vorkommenden proteolytischen Aktivität vom Inhibitor gehemmt wird. Der an Proteasen gebundene Inhibitor ist im Sekret nicht mehr nachweisbar.

Diese Tatsache allein lieferte jedoch noch keine befriedigende Erklärung für die erheblichen Konzentrationsunterschiede des Inhibitors im gesunden und pathologischen Nasensekret.

Es galt nun, weitere Kriterien heranzuziehen, die Aufschluß über den Funktionszustand der Nasenschleimhaut im Verlauf der einzelnen Erkrankungen geben könnten.

Die in den einzelnen Stadien der Erkrankung gefundenen Präkallikreinkonzentrationen stimmen mit dem Abfall und Anstieg der Inhibitorwerte überein.

Da jedoch nicht abgeklärt werden kann, ob das gesamte vorhandene Präkallikrein ein Produkt der Nasenschleim-

haut darstellt, oder ob zusätzlich eine passive Diffusion aus den pathologisch stark erweiterten Gefäßen erfolgt, läßt die Bestimmung der Präkallikreinkonzentration keine endgültige Aussage zu.

Wir bestimmten daher als weiteren Parameter das Lysozym, dessen Vorkommen im Nasensekret bereits von FLEMING (25) und PANEBIANCO (26) beschrieben wurde.

Auch der Lysozymgehalt des Nasensekrets ist in den ersten Tagen der Infektion stark vermindert. Sowohl Lysozym wie auch Inhibitor sind Produkte der Nasenschleimhaut.

Diese Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß zwei Mechanismen existieren, die für den verminderten Inhibitorgehalt während der Erkrankung verantwortlich sind.

Unsere Beobachtungen decken sich mit dem histologischen Bild:

In den ersten drei Tagen der Infektion werden die oberflächlichen Anteile des Epithels abgestossen. Etwa vom fünften Tage an wird eine neue Epithelschicht gebildet. Die Produktion von Inhibitor und Lysozym nimmt wieder zu.

Während des Epithelzerfalls gelangt eine große Anzahl von Leukozyten in das Nasensekret. Diese werden dort aufgelöst, wobei aus ihren Granula Peroxydase freigesetzt wird. Die Peroxydaseaktivität im Nasensekret verhält sich daher konträr zu den übrigen Parametern. Sie steigt in den ersten Tagen der Infektion stark an. Während der Restitution des Epithels gelangen immer weniger Leukozyten in das Sekret, - die Peroxydaseaktivität nimmt wieder ab.

Der Inhibitor besitzt also eine physiologische Schutzfunktion, die allerdings begrenzt ist. HOCHSTRASSER und REICHERT (2) konnten nämlich in einzelnen pathologischen Sekreten proteolytische Aktivität nachweisen.

In diesen Fällen war also die Kapazität des Inhibitors erschöpft. Weiterhin konnte eine Leukozytenprotease, die Basalmembranen abbaut, identifiziert werden. Durch sie kommt es, nach Dekompensation des inhibierenden Systems, zu einer Schädigung der Schleimhaut.

E) EXPERIMENTELLER TEIL

I) Sekretentnahme

Sie erfolgt durch Einlegen eines mit physiologischer NaCl-Lösung getränkten Baumwolltampons in die Nasengänge (10 min.). Das an den Tampons haftende Sekret wird anschließend mit je 2 ml Boratpuffer, pH 8,0, 0,05M extrahiert (1).

II) Proteinbestimmung

1) Material:

5 n NaOH, 30% Essigsäure, Ninhydrinreagens, Propanol.

2) Methode:

0,5 ml Sekreteluat werden in Reagensgläser pipettiert und nach Zugabe von 1,0 ml 5 n NaOH 60 min lang im kochenden Wasserbad hydrolysiert. Nach Beifügung von 1,0 ml 30%iger Essigsäure und 2 ml Ninhydrinreagens (8 g Ninhydrin in 200 ml 4 n Na-Acetat-Puffer pH 5,5, 50 mg SnCl_2) 30 min im Wasserbad Farbe entwickeln; anschließend mit 5 ml Propanol-Wasser (1:1) verdünnen. Die Extinction wird gegen H_2O gemessen (578 nm). Die Proteinwerte werden aus der

Eichkurve abgelesen. Die Eichkurve wurde mit 100, 200 und 300 μ g Serumprotein nach der oben beschriebenen Methode erstellt (1).

III) Kallikreinbestimmung im Nasensekret

1) BAEE - Test (6)

a) Material:

Pyrophosphat-Semicarbacid-Glycin-Puffer (pH 8,7); Trypsinlösung 10 μ /0,2 ml Aqua bidest. (= 10 EmU/0,2 ml); spezifischer Trypsininhibitor aus weißen Bohnen, lyophilisiert, 1 mg/2 ml Aqua bidest.; Sekreteluat, ca. 3 - 4 Std. nach Entnahme; Nicotinamid-adenin-dinucleotid (30 mM NAD, Fa. Boehringer, Mannheim); Benzoyl-L-arginin-äthyl-ester (6 mM, Fa. Merck AG, Darmstadt); Alkohol-Dehydrogenase (30 mg Enzymprotein/ml Fa. Boehringer, Mannheim).

b) Methode:

Puffer: 15,2 g Natrium-Pyrophosphat, 4,1 g Semicarbacid und 0,9 g Glycin werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, mit 2 n NaOH auf pH 8,7 eingestellt und dann auf 500 ml aufgefüllt (27).

2,0 ml Puffer werden mit 0,2 ml (= 10 EmU) Trypsin und 0,1 ml Sekret bei 25°C 15 min lang inkubiert. Die Mischung wird dann mit 0,1 ml (2 mg) NAD-Lösung, 0,02 ml ADH und 0,5 ml (0,5 mg) BAEE-Lösung versetzt und umgerührt.

Die Extinction dieser Messlösung (Volumen: 3 ml) wird nach 5 minütiger Inkubation bei 366 nm gegen einen Leerwert, der statt 0,1 ml Sekret 0,1 ml Puffer enthält, gemessen (nächste Messung nach 5 Minuten). Die Messungen erfolgen temperaturstabilisiert bei 25°C.

Von der registrierten Extinctionsdifferenz muß die des Leerwerts abgezogen werden.

2) BAPA - Test (28)

a) Material:

0,2 M TRA-Puffer (0,01 M CaCl₂, pH 7,8);
100 mg BAPA-Substrat in 100 ml deion.
H₂O gelöst (Fa. Schuchardt, München),
lyophilisiertes Trypsinpräparat.

b) Methode:

0,2 ml Trypsinlösung werden mit TRA-Puffer auf 2,0 ml ergänzt. Durch Zugabe von 1 ml (1 mg) BAPA-Substratlösung wird die Reaktion in einer 3 ml-Glasküvette (Schichtdicke 1,000 cm) gestartet (Messung bei 405 nm).

Nach der Definition von TRAUTSCHOLD (7) entspricht eine Extinctionsänderung von ΔE 0,00332/min einer EmU ($1 \text{ EmU} = 10^{-3}$ Enzymeinheiten).

3) Hemmwertbestimmung

0,2 ml der Trypsinlösung werden mit der zu messenden inhibitorhaltigen Lösung versetzt und mit TRA-Puffer auf 2,0 ml aufgefüllt. Die Menge der Testlösung sollte zwischen 0,01 und 0,2 ml betragen und so bemessen sein, daß sie eine 50%ige Hemmung der Trypsinlösung bewirkt. Dadurch können Messungen im nichtlinearen Teil der Hemmkurve vermieden werden (29). Nach Durchmischen der Lösung wird etwa 1 - 2 min bei 25°C vorinkubiert. Die Messung erfolgt nach Zugabe von 1 ml BAPA-Lösung temperaturstabilisiert ebenfalls bei 25°C und 405 nm.

Für die Berechnung des Inhibitorgehalts gilt im obengenannten Bereich der Hemmkurve:

$$\Delta E_{\text{Trypsinvergleichswert}} - \Delta E_{\text{Hemmwert}} = \Delta E_{\text{Verminderung}}$$

$$\frac{\Delta E_{\text{Verminderung}}}{0,00332} = \text{Zahl der ImU in der vorgelegten Menge}$$

4) Trasylolemmkurve von Nasensekret

a) Material:

Trasylo^R (Fa. Bayer, Leverkusen); die übrigen Reagentien wie bei BAEE- und BAPA-Test.

b) Methode:

Zunächst wird das vorhandene Trasylo^R mit Hilfe des BAPA-Tests auf seine Hemmaktivität untersucht.

Für die Hemmkurve wird der BAEE-Test wie oben beschrieben ausgeführt. Die dabei verwendeten 0,1 ml Sekreteluat/Küvette werden einem Gemisch aus verschiedenen Sekreten entnommen. Vor Zugabe des Substrats gibt man in die einzelnen Küvetten steigende Trasylo^R-mengen (zwischen 0,02 und 0,5 ml), die vorher beim Puffer eingespart wurden. Auf diese Weise beträgt das Küvettenvolumen immer 3,02 ml.

5) Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein durch Leukozytenproteasen

a) Bestimmung der Proteasenaktivität (2)

α) Material:

Leukozytenproteasen, die aus dem Kieferhöhleneiter verschiedener Patienten stammen. Das Material wurde im Zellhomogenisator

in 0,05 M Boratpuffer, pH 8,0, aufgeschlossen, hochtourig zentrifugiert und der klare Überstand für die Untersuchungen verwendet; 5%ige Trichloressigsäure; Azocasein (Fa. Serva); Phosphatpuffer 0,1 M, pH 8,0.

β) Methode

Azocasein wird in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 8,0) gelöst (20 mg Azocasein/ml Puffer) und anschließend gekocht. Dann werden jeweils 2,0 ml der Azocaseinlösung mit Leukozytenproben zwischen 0,1 und 0,3 ml versetzt und mit Puffer auf 3,0 ml aufgefüllt. Die Gemische werden daraufhin 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend jeweils mit 3 ml 5%iger Trichloressigsäure gefällt. Nach Zentrifugieren bei 6000 Umdrehungen/min wird der Überstand filtriert und gegen den Reagentienleerwert bei 366 nm gemessen.

b) Hemmbarkeit der Leukozytenproteasen durch den Inhibitor aus Nasensekret (1)

Es wird die gleiche Versuchsanordnung mit Zugabe von steigenden Sekretmengen verwendet.

c) Aktivierungsversuch

Für die Aktivierung von Präkallikrein zu Kallikrein verwendet man den BAEE-Test. An Stelle von Trypsin werden Leukozytenproteasen zugegeben. Da sie ebenfalls BAEE spalten und nicht selektiv gehemmt werden können, benötigt man einen Leerwert mit Leukozyten ohne Sekret (Inkubation und übrige Reagentien siehe BAEE-Test).

6) Nachweis von Kallikrein im Nasensekret
durch Test am Hundeblutdruck

In die freipräparierte Arteria carotis sinistra des Hundes wird ein Manometer eingebunden. Das Manometer ist direkt mit einem Schreiber verbunden, der die Blutdruckschwankungen aufzeichnet. Zu Beginn des Versuchs werden dem Tier 4,0 ml Nasensekret (Gemisch aus verschiedenen Patientensekreten) in die Vena saphena magna injiziert. Aus dem nachfolgenden Blutdruckabfall kann die Kallikreinaktivität bestimmt werden (siehe S. 10).

IV) Lysozymbestimmung im Nasensekret (13)

1) Material:

1/15 M Phosphatpuffer, pH 6,2; 1%ige NaCl-Lösung, *Micrococcus lysodeicticus*-Zellfragmente (Fa. Serva), Sekreteluat.

2) Methode:

80 mg *Micrococcus lysodeicticus* werden in 90 ml 1/15 M Phosphatpuffer, pH 6,2 und in 10 ml 1%iger NaCl-Lösung aufgenommen. Die Transmission dieser Substratlösung wird bei 650 nm am Eppendorf-Photometer gegen H₂O gemessen und als Eichung für die nachfolgende Bestimmung verwendet. Die Messung der Enzymkinetik erfolgt am Leitz Unicam UV-Spektralphotometer bei 650 nm, da bei dieser Wellenlänge die übrigen Photometer keine präzisen Werte liefern. In die Messküvette werden nacheinander 2,0 ml Substratlösung, 0,4 ml Phosphatpuffer und 0,1 ml Sekreteluat pipettiert und nach kurzer Durchmischung sofort gemessen. Die Transmissionszunahme wird in Abständen von je 1/2 Minute abgelesen und automatisch registriert.

3) Lysozymeichkurve

a) Material:

1/15 M Phosphatpuffer, pH 6,2; 1%ige NaCl-Lösung, *Micrococcus lysodeicticus*-Zellfragmente, Lysozym (Fa. Serva).

b) Methode:

Die Substratlösung wird nach dem oben erläuterten Verfahren hergestellt. Jeweils 2 ml dieser Lösung werden mit steigenden Mengen der Lysozymstandardlösung (5 mg/100 ml Aqua bidest.) von 0,05 ml bis 0,5 ml versetzt und mit Phosphatpuffer auf jeweils 2,5 ml aufgefüllt. Die dabei erhaltenen Messwerte werden zur Erstellung einer Eichkurve verwendet.

Die Benennung von Lysozym aus Nasensekret wird so gewählt, daß 1 μ einem Milligramm des Lysozymstandardpräparates entspricht.

V) Peroxydasebestimmung im Nasensekret

1) Material:

Benzidin (Fa. Merck, Darmstadt), Eisessig, 0,1%ige H_2O_2 -Lösung; Sekreteluat.

2) Methode:

500 mg Benzidin werden in 3 ml Eisessig gelöst und mit Aqua bidest. auf 100 ml aufgefüllt. 2 ml dieser Lösung und 1 ml 0,1%ige H_2O_2 -Lösung werden anschließend in ein Reagensglas pipettiert. Die Reaktion startet man mit der Zugabe von 0,5 ml Sekreteluat.

Nach genau 10 Minuten wird die Extinction dieser Lösung gegen einen H_2O -Leerwert bei 578 nm in einem Eppendorf-Photometer gemessen.

F) ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Der im Arbeitskreis HOCHSTRASSER erstmals nachgewiesene Inhibitor aus Nasensekret (1) wurde bei ausgewählten Patientengruppen bestimmt.
- 2) Zur Abklärung der pathophysiologischen Vorgänge im Verlauf der verschiedenen Rhinopathien wurde als weiterer Parameter das Enzym Kallikrein erstmals im Nasensekret nachgewiesen und parallel zum Trypsininhibitor gemessen. Das Sekret enthält überwiegend die inaktive Vorstufe des Enzyms, das Präkallikrein. Aktives Kallikrein liegt nur in geringen, kaum messbaren Konzentrationen vor.
- 3) Es wurde weiterhin die simultane Bestimmung von Lysozym, das wie der Inhibitor von der Nasenschleimhaut produziert wird, durchgeführt.
- 4) Als Maß für die Anzahl der in das Sekret emigrierten Leukozyten diente der Nachweis von Peroxydase. Dieses Ferment wird beim Leukozytenzerfall frei.
- 5) Der für den Inhibitor aus Nasensekret bereits beschriebene Konzentrationsabfall im Verlaufe verschiedener Rhinopathien (3) konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für die Enzyme

Kallikrein und Lysozym nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Vermutung, daß die Verminderung des Inhibitorgehalts auf eine Schädigung und die dadurch bedingte Funktionseinschränkung der Nasenschleimhaut zurückzuführen sei. Ein weiteres Absinken des Inhibitors kommt durch die Hemmung von Bakterienproteasen zustande (2).

Einen zu den genannten drei Parametern gegensinnigen Verlauf zeigt die Aktivität der Peroxydase im pathologischen Nasensekret. Sie steigt in den ersten Tagen der Erkrankung an und sinkt später wieder auf einen kaum messbaren physiologischen Wert. Ihre Bestimmung gibt Aufschluß über die Schädigung der Schleimhaut, die das Eindringen von Leukozyten in das Sekret ermöglicht, und ihre anschließende Restitution.

G) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) K. Hochstrasser, H. Haendle, R. Reichert,
E. Werle, Z. physiol. Chem. 352 (1971)
- 2) K. Hochstrasser, R. Reichert, M. Matzner
u. E. Werle, Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem.
10, 104 - 107 (1972)
- 3) R. Reichert u. K. Hochstrasser, Z. Laryng.
Rhinol. 51, 190 (1972)
- 4) E. K. Frey, H. Kraut u. E. Werle, "Das
Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren",
Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart (1968)
- 5) K. Hochstrasser, R. Reichert, M. Eisenmann,
Arch. klin. exp. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.Heilk.
203, 109 - 114 (1972)
- 6) I. Trautschold, E. Werle, Z. physiol. Chem.
325, 48 (1961)
- 7) I. Trautschold, Habilitationsschrift, Med.
Fakultät d. Univ. München (1965)

- 8) H. Fritz, I. Trautschold u. E. Werle, Z. physiol. Chem. 342, 253 (1965)
- 9) M. E. Webster, "Report of the Committee on nomenclature for hypotensive peptides", in E. G. Erdös, N. Back u. F. Sicuteri: "Hypotensive Peptides", Springer Verlag, New York (1966)
- 10) I. Trautschold u. G. Rüdell, Klin. Wschr. 41, 297 (1963)
- 11) E. Werle, Dtsch. Med. Wschr. 92, 1573 (1967)
- 12) A. Fleming, Royal Soc. Proc. B 93, 306 (1922)
- 13) P. Jollès, Methods in Enzymology, Vol. V, 137 - 140 (1960)
- 14) P. Jollès, M. Leduc u. S. Zuili, Biochim. et Biophys. Acta 39, 212 (1960)
- 15) R. A. Kern, M. J. Kindgale, S. F. Kern, O. K. Berens, J. Bacteriol. 61, 171 (1951)
- 16) R. G. Peterson, S. E. Hartsell, J. infect. Dis. 96, 75 (1955)

- 17) M. Cutinelli-La-Manna, Boll. Soc. It. Biol. 23, 1149 (1942)
- 18) Matrattia-Alleggra, Boll. Soc. It. Biol. 34, 909 (1958)
- 19) K. G. Paul in P. D. Boyer, H. Lardy u. K. Myrbäck: The enzymes, Academ. Press, London, Bd. VIII, 2. Aufl., 227 (1963)
- 20) G. Alderton, W. H. Ward u. H. L. Fevold, J. Biol. Chem. 157, 43 (1945)
- 21) G. Alderton, H. L. Fevold, J. Biol. Chem., 164, 1 (1946)
- 22) H. Fraenkel-Conrat, Arch. Biochem. Biophys. 27, 109 (1950)
- 23) N. Henning, L. Demling, U. Härtlein, Dtsch. Arch.Klin. Med. 196, 233 (1949)
- 24) R. Reichert, K. Hochstrasser u. E. Werle, Klin. Wschr. 49, 1234 (1971)
- 25) A. Fleming, V. D. Allison, Proc. Roy. Soc. Med., 94, 142 (1923)

- 26) G. Panebianco, E. Manara, Otorinolaring. ital.
27, 79 (1958)
- 27) H. Fritz, I. Eckert u. E. Werle, Z. physiol.
Chem. 348, 1120 (1967)
- 28) I. Trautschold, H. Fritz u. E. Werle in "Hypo-
tensive Peptides", 221, Springer-Verlag, New
York (1966)
- 29) H. Tschesche u. H. Klein, Z. physiol. Chem.
349, 1645 (1968)
- 30) Sch. Moschkowski, Münch.med.Wschr. 76, 1800
(1929); 77, 403 (1930)

LEBENS LAUF

Am 5. 9. 1947 wurde ich als erstes Kind des Maschinentechnikers Johann Eisenmann und seiner Ehefrau Therese in Gars/Inn geboren. Dort besuchte ich von 1953 bis 1957 die Volksschule.

Nach dem Tod meines Vaters übersiedelten wir nach Rosenheim, wo ich im Juli 1968 am Neusprachlichen Gymnasium die Reifeprüfung ablegte.

Im Herbst 1968 nahm ich an der Universität München das Studium der Humanmedizin auf. Ich bestand die naturwissenschaftliche Vorprüfung im Herbst 1969, die ärztliche Vorprüfung im Frühjahr 1971.

Als meine erste Veröffentlichung erschien im Herbst 1971 der Band "Nervensystem" im Verlag Scriptum Medici.

Zur Zeit befinde ich mich im 10. Studiensemester.

